

MEDICINE FOR ENHANCING ACTION OF CELL DIFFERENTIATION-INDUCING FACTOR

Patent number: JP9151132
Publication date: 1997-06-10
Inventor: FUJISAWA YUKIO; HASAMA MASAOKI; IWAGAMI NORIHISA
Applicant: TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD
Classification:
- international: *A61K31/36; A61K31/365; A61L27/00; C07D317/70; C07D493/04; A61K31/357; A61K31/365; A61L27/00; C07D317/00; C07D493/00; (IPC1-7): A61L27/00; A61K31/36; A61K31/36; A61K31/365; C07D317/70; C07D493/04*
- european:
Application number: JP19960033570 19960221
Priority number(s): JP19960033570 19960221; JP19950032703 19950221; JP19950248994 19950927

Report a data error here

Abstract of JP9151132

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicine for enhancing the action of a cell differentiation-inducing factor, having e.g. a strong BMP action-enhancing activity, a bone formation-promoting activity and a neurotrophic factor-enhancing activity, and capable of being used for treating and preventing various bone diseases or neuropathies. **SOLUTION:** This medicine for enhancing the action of a cell differentiation-inducing factor also as a bone disease or neuropathy-treating or preventing composition or as a bone formation-promoting medicine contains helioxanthin or its lactone-opened product or its salt (hereinafter referred to as helioxanthin, etc.). It is also defined as a composition containing helioxanthin, etc., and a cell differentiation-inducing factor or that using helioxanthin, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-151132

(43) 公開日 平成9年(1997)6月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/36	A E D		A 6 1 K 31/36	A E D
	A A M			A A M
31/365	A A P		31/365	A A P
	A B J			A B J
C 0 7 D 317/70			C 0 7 D 317/70	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平8-33570	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成8年(1996)2月21日	(72) 発明者	藤沢 幸夫 兵庫県神戸市東灘区御影中町4丁目1番31-104号
(31) 優先権主張番号	特願平7-32703	(72) 発明者	波佐間 正聡 大阪府池田市五月丘2丁目7番28-102号
(32) 優先日	平7(1995)2月21日	(72) 発明者	岩上 範久 大阪府河内長野市楠町西897-17
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(31) 優先権主張番号	特願平7-248994		
(32) 優先日	平7(1995)9月27日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 細胞分化誘導因子作用増強剤

(57) 【要約】

【課題】 例えば強いBMP作用増強活性、骨形成促進活性および神経栄養因子作用増強活性を有し、種々の骨疾患もしくは神経性疾患の治療および予防に用いることができる、細胞分化誘導因子の作用増強剤を提供する。

【解決手段】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩（以下、ヘリオキサンチン等という）を含有してなる細胞分化誘導因子作用増強剤、骨疾患または神経性疾患の治療・予防用組成物、または骨形成促進剤；ヘリオキサンチン等と細胞分化誘導因子とを含有してなる組成物；およびヘリオキサンチン等を使用することを特徴とする細胞分化誘導因子作用増強方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる細胞分化誘導因子作用増強剤。

【請求項2】 細胞分化誘導因子が骨形成因子である請求項1記載の細胞分化誘導因子作用増強剤。

【請求項3】 細胞分化誘導因子が神経栄養因子である請求項1記載の細胞分化誘導因子作用増強剤。

【請求項4】 神経栄養因子がニューロトロフィック・ファクター・ファミリーである請求項3記載の細胞分化誘導因子作用増強剤。

【請求項5】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる骨疾患の治療・予防用組成物。

【請求項6】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる神経退行性疾患の治療・予防用組成物。

【請求項7】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩と細胞分化誘導因子とを含有してなる組成物。

【請求項8】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を使用することを特徴とする細胞分化誘導因子作用増強方法。

【請求項9】 ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる骨形成促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、骨粗鬆症または骨折などの骨疾患の治療・予防、骨再建、あるいはアルツハイマー病、脳血管性痴呆、筋萎縮性側索硬化症（ロウ・ゲーリッヒ病）、糖尿病性の末梢神経障害（ニューロパシー）など神経性疾患の治療・予防に有効な細胞分化誘導因子作用増強剤に関する。

【0002】

【従来の技術】骨形成因子（bone morphogenetic protein, BMP）は、脱灰骨から単離された異所性の骨誘導能を有することが知られている唯一の蛋白因子群である。従って、骨折治療や骨再建などにおける骨形成促進薬として有用である〔A. E. Wang、トレンズ・イン・バイオテクノロジー（Trends Biotechnol.）、11巻、379-383頁（1993）〕。また、BMPは骨芽細胞の分化を直接促進することから、骨リモデリングにおけるカップリング・ファクターとしての役割が想定されており、骨代謝との密接な関わりがあると考えられる。また、老齢動物における骨基質中のBMP含量は相当低下していることが報告されており〔M. L. Urist、ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ（Bone and Mineral Research）、6巻（ed by W. A. Peck）、57-112頁、Elsevier、1989〕、骨量の維持にBMPが深く関与していると考えられる。このことは、BMPが骨粗鬆症などの様々な骨疾患に対する治療薬として有

望であることを示唆している。しかし、BMPは生体内には通常微量しか存在せず、その供給源が限られていること、またBMPは蛋白質であることから投与する場合問題があり、適用できる対象疾患はごく限られている。

【0003】さらに、BMPは神経栄養因子様の活性を有することが報告されている〔V. M. Paralkarら、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー（J. Cell Biol.）、119巻、1721-1728頁（1992）〕。また、脳組織には、BMP遺伝子の強い発現が知られている〔E. Ozkaynakら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション（Biochem. Biophys. Res. Commun.）、179巻、116-123頁（1991）〕。また、BMPが胚発生時の神経管形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている〔K. Baslerら、セル（Cell）、73巻、687-702頁（1993）〕。従って、BMPは神経細胞の分化あるいは機能維持に深く関与していると考えられる。

【0004】神経栄養因子（neurotrophic factor）は神経細胞の生存維持および機能発現において重要な役割を担っている一群の蛋白性因子で、神経成長因子（nerve growth factor: NGF）、脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor: BDNF）、ニューロトロフィン3（neurotrophin-3: NT-3）などがある。NGFは、末梢神経系では神経冠の交感神経節細胞（sympathetic ganglion）および脊髄後根神経節細胞（dorsal root ganglion）の分化・成熟を促進し〔A. M. Davies & R. M. Lindsay、ディベロップメンタル・バイオロジー（Dev. Biol.）、111巻、62-72頁（1985）；R. Levi-Montalcini、エンボ・ジャーナル（EMBO J.）、6巻、1145-1154頁（1987）〕、中枢神経系では中隔野（前脳基底核）のコリン作動性神経細胞（cholinergic neurons of septa）に作用する〔H. Gnahnら、ディベロップメンタル・ブレイン・リサーチ（Dev. Brain Res.）、9巻、45-52頁（1983）；H. Hatanaka & H. Tsukui、Dev. Brain Res.、30巻、47-56頁（1986）；F. Hefti、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス（J. Neurosci.）、6巻、2155-2162頁（1986）〕。NGFは神経細胞の分化が完了した後も神経機能を維持するために必要である。BDNFは、末梢神経系では脊髄後根神経節細胞や節状神経節細胞に対して作用するが、交感神経節細胞には作用しない〔R. M. Lindsay & H. Rohrer、Dev. Biol.、112巻、30-48頁（1985）；R. M. Lindsayら、Dev. Biol.、112巻、319-328頁（1985）；A. M. Daviesら、J. Neurosci.、6巻、1897-1904頁（1986）〕。一方、中枢神経系では中隔野のコリン作動性神経細胞やギャバ（GABA: γ -aminobutyric acid）作動性神経細胞、および中脳のドーパミン作動性神経細胞（dopaminergic neurons of midbrain）に作用する〔R. F. Aldersonら、ニューロン（Neuron）、5巻、297-306頁（1990）；C. Hymanら、ネイチャー（Nature）、350巻、230-232頁（1991）；B. Knuselら、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ

・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 88巻, 961-965頁 (1991)〕。NT-3は、末梢神経系ではNGFやBDNFと重なるが、神経板由来の知覚神経細胞に強い作用を示すのが特徴である〔P. Ernforsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87巻, 5454-5458頁 (1990) ; A. Rosenthalら、Neuron, 4巻, 767-773頁 (1990)〕。しかし、NT-3に応答する中枢神経系の神経細胞はまだ知られていない。

【0005】アルツハイマー型痴呆症は、中隔野を含む前脳基底核のコリン作動性神経細胞の変性・脱落以外にも、大脳皮質神経細胞の広範な障害・脱落が認められており、NGFや新しい栄養因子もその治療薬の一つの候補と考えられている〔F. Hefti & W. J. Weiner, アニュアル・ニューロロジー (Annu. Neurol.), 20巻, 275-281頁 (1986)〕。また、脳の中脳ドーパミン作動性神経細胞が変性脱落する疾患であるパーキンソン病には、その神経細胞に対する栄養因子であるBDNFに治療薬としての期待がある。しかし、これら神経栄養因子は蛋白質であるため、その適用には限界がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上述の点からみて、例えば、BMPの作用を増強する化合物であれば、生体内に存在するBMPまたは生体に投与されたBMPの作用を強めることができ、上記のような骨疾患治療薬として有用である。そのようなBMP作用増強活性を有する物質は、現在までに報告のあるものとして、レチノイン酸、ビタミンD3、エストロゲン、およびグルココルチコイドがある〔V. Rosen & R. S. Thies, トレンズ・イン・ジェネティックス (Trends Genet.), 8巻, 97-102頁 (1992) ; Y. Takuwaら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 174巻, 96-101頁 (1991)〕。しかし、これらの物質は体内に投与した場合、骨吸収を促進したり、高カルシウム血症や卵巣ガンの発生などの副作用が知られており、骨疾患治療薬として必ずしも適当ではない。

【0007】一方、例えばNGFの作用を増強する化合物であれば、生体内に存在するNGFまたは生体に投与されたNGFの作用を強めることができ、前述のような抗痴呆薬や抗末梢神経傷害薬として有用である。そのような作用を有する物質としては、サベルゾール〔sabeluzole, 4-(2-Benzothiazolylmethyl-amino)- α [(p-fluorophenoxy)methyl]-1-piperidineethanol) が報告されている〔ニュー・カレント (New Current), 第4巻26号, 14頁 (1993年)〕が、その作用機構については未だに解明されておらず、臨床試験において、頭痛、めまい、疲労感などの副作用が認められており、神経性疾患治療薬として必ずしも適当ではない。また、NGFの分泌誘導作用を有する化合物として、ステロイド類、カテコール類および

サイトカイン類の報告があり〔エクスペリメンタル・ニューロロジー (Experimental Neurology), 124巻, 36-42頁 (1993)〕、特開平3-81218号公報にはイデベノンの報告がある。しかし、これらの化合物は、神経毒性を有するもの、あるいは免疫力の低下、高カルシウム血症、骨吸収の促進など好ましくない作用を有するものがあり、NGF分泌誘導作用と神経系以外の組織への悪影響とは必ずしも分離できないのが現実であり、実用には十分満足できるものではない。さらに、BMPまたは神経栄養因子に代表される細胞分化誘導因子は蛋白質であるため、生体への投与においては限界がある。そこで、生体内に存在する細胞分化誘導因子または生体内に投与された細胞分化誘導因子の作用を増強する化合物として、低分子のものが好ましい。従って、本発明は、BMPまたは神経栄養因子に代表される細胞分化誘導因子の作用を増強する低分子化合物を見だし、種々の骨疾患または神経性疾患の治療および予防に有用な細胞分化誘導因子作用増強剤を提供しようとするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる技術背景のもとに、BMPや神経栄養因子による骨芽細胞や神経細胞の分化を特異的に増強する薬物の開発を目的とし、細胞分化誘導因子の作用を増強する低分子化合物を探索すべく鋭意研究を進めた結果、ヘリオキサンチンにBMPや神経栄養因子の作用を増強する優れた活性のあることを初めて見だし、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は、ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる細胞分化誘導因子作用増強剤である。以下に詳細に説明するが、該細胞分化誘導因子は、好ましくは、骨形成因子、神経栄養因子、特に好ましくはニューロトロフィック・ファクター・ファミリーである。また、本発明は、ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる骨疾患または神経退行性疾患の治療・予防用組成物をも提供する。さらに、本発明は、ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩と細胞分化誘導因子とを含有してなる組成物をも提供する。また、本発明は、ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を使用することを特徴とする細胞分化誘導因子作用増強方法をも提供する。さらに、本発明は、ヘリオキサンチン、またはそのラクトン開裂体またはその塩を含有してなる骨形成促進剤をも提供する。

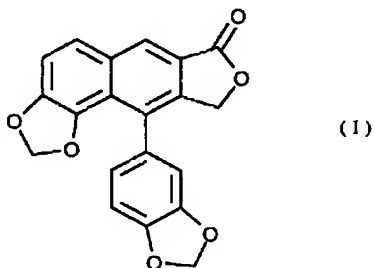
【0010】

【発明の実施の形態】本発明に用いられるリグナン誘導体であるヘリオキサンチン〔helioxanthin: 1-(3,4-methylene-dioxyphenyl)-2-hydroxymethyl-7,8-methylenedioxy-3-naphthoic acid lactone〕は、キク科の植物の成分として最初に同定された公知化合物である〔R. S. Burdenら、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ササイアテ

イ、セクションC (J. Chem. Soc. (C)), 693-701 (1969)〕。また、ヘリオキサンチンは生薬として知られるキツノマゴ科の植物からも単離されている[J. M. Trujilloら、ファイトケミストリー (Phytochemistry), 29, 2991-2993 (1990)]。ヘリオキサンチンの構造は下記の式(I)で表されるものであり、前述のBMPまたはNGFの作用増強活性を有する物質とは構造的に全く異なるものである。

【0011】

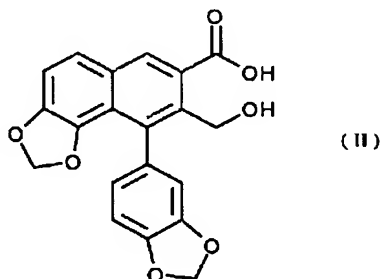
【化1】



【0012】なお、ヘリオキサンチンの化学合成法については、ジャーナル・オブ・ナチュラール・プロダクト [J. of Natural Product, 第52巻(2), 367-375頁(1989年)]に記載がある。本発明で用いるヘリオキサンチンのラクトン開裂体は、式(II)：

【0013】

【化2】



【0014】で表され、これは、ヘリオキサンチンのラクトン部分を自体公知の方法で加水分解してカルボキシル基と水酸基を形成させることにより製造することができる。

【0015】該ラクトン開裂体(II)の塩としては、生理学的に許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばアンモニウム塩の他、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノー

ルアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。これらの塩は、常法にしたがって得ることができる。

【0016】本発明で対象とする細胞分化誘導因子としては、骨形成因子、神経栄養因子、腫瘍増殖因子(TGF)- β またはアクチビンなどのTGF- β スーパーファミリーに属する因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)または酸性繊維芽細胞増殖因子(aFGF)などのFGFスーパーファミリーに属する因子、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor；LIF、またはcholinergic differentiation factor；CDFと呼ぶこともある)またはシリアリー・ニューロトロフィック・ファクター(ciliary neurotrophic factor；CNTF)などのニューロポイエティック・サイトカイン・ファミリー(neuropoietic cytokine family)に属する因子、インターロイキン-1(IL-1、以下同様に略記する)、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターフェロン- γ (INF- γ)など骨芽細胞や神経細胞のように特定の組織において生体機能を維持する細胞が未分化な前駆体から分化する過程に特徴的な形質を誘導する因子が挙げられ、好ましくは骨形成因子または神経栄養因子が挙げられる。骨形成因子としては、骨形成および軟骨形成を促進させる蛋白質であるBMP-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12などのBMPファミリー、とりわけBMP-2、-4、-6、-7が挙げられる。BMPは上記に挙げた因子のそれぞれのホモ二量体または可能なすべての組み合わせによるヘテロ二量体であってもよい。神経栄養因子としては、神経成長因子(nerve growth factor；NGF)、脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor；BDNF)およびニューロトロフィン3(neurotrophin-3；NT-3)、グリア由来神経栄養因子(glia-derived neurotrophic factor；GDNF)、NT-4/5などが挙げられ、好ましくはNGFファミリーが挙げられる。

【0017】本発明のヘリオキサンチン含有してなる細胞分化誘導因子作用増強剤は、単独でまたは細胞分化誘導因子作用を有する物質、例えばBMPや神経栄養因子と併用して、骨折治癒促進、骨再建促進、骨粗鬆症など種々の骨疾患の治療および予防に、また、脳血管性痴

呆、老年性痴呆症もしくはアルツハイマー病などにおける神経退行性疾患、筋萎縮性側索硬化症（ロウ・ゲーリッヒ病）または糖尿病性の末梢神経障害（ニューロパシー）など種々の脳機能障害もしくは神経性疾患の治療および予防に用いることができる。本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤は、そのようなBMPや神経栄養因子などが関与する疾患に対する治療薬および予防薬として用いることもできる。本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤は、ヒトはもちろん、その他の哺乳動物（例、マウス、ラット、ウサギ、犬、猫、牛、豚など）の上記疾患に適用することもできる。

【0018】本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤をヒトに投与する場合、投与方法は、経口的、非経口的いずれのルートによってもよい。本発明における細胞分化誘導因子作用増強剤は、ヘリオキサンチンまたはそのラクトン開裂体もしくはその塩を含有させること以外は、製剤製造の公知手段にしたがって製造することができる。本発明において、ヘリオキサンチンまたはそのラクトン開裂体もしくはその塩は、単独または生理学的に許容される担体と配合して使用される。担体と配合される場合、ヘリオキサンチンまたはそのラクトン開裂体もしくはその塩の含有量は、調剤により適宜選択されればよい。本発明製剤中のヘリオキサンチンまたはそのラクトン開裂体もしくはその塩の含有量は、通常約0.3～100重量%、好ましくは、約0.5～20重量%である。

【0019】経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤または懸濁剤などが挙げられる。かかる組成物は、自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体を含有するものである。かかる担体としては生理学的に許容される担体であり、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤など；液状製剤における懸濁化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を適宜選択して適量用いることもできる。

【0020】賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウ

ム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。

【0021】懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、などの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

【0022】非経口投与のための組成物としては、例えば注射剤、座剤などが挙げられ、注射剤は皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は自体公知の方法、すなわちヘリオキサンチンまたはそのラクトン開裂体もしくはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水溶性または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって水溶液として調製される。注射用の水性液としては生理食塩水、等張液などが挙げられ、必要により適当な懸濁化剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、非イオン性界面活性剤などを適宜適量併用してもよい。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は通常適当なアンプルに充填される。

【0023】ある特定の患者の投与量は、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行っている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤の投与量は、上記疾患の種類や症状によって適宜選択されるが、例えば、骨粗鬆症の場合、成人（50kg）1日当たり、経口投与の場合、ヘリオキサンチンまたはそのラクトン開裂体もしくはその塩として、約0.1～500mg、好ましくは約1～50mg、さらに好ましくは約3～50mg投与すればよい。1回分の服用量は、このような一日当たりの投与量と剤形などを考慮し決定される。また投与回数は特に制限されないが、好ましくは1～5回/日、さらに好ましくは1～3回/日である。ヘリオキサンチンは、前述のように、生薬の成分として知られたものであり、毒性は低い。

【0024】本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤は、骨形成促進活性が強いため、骨修復や骨移植の際の骨形成促進薬として骨再建用の担体に混合することもできる。例えば、本発明の化合物を金属、セラミック、ある

いは高分子を材料とする人工骨などに付着または含有させて用いることができる。人工骨は、それが骨欠損部に移植された際に生体組織において本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤が放出されるように表面を多孔性にするのが好ましい。本発明の化合物は、適当な分散剤、結合剤、希釈剤など（例えば、コラーゲン、生理食塩水、クエン酸溶液、酢酸溶液、ハイドロキシアパタイト、フィブリンまたはこれらの混合液など）に分散させ、これを人工骨に塗布または含浸し、乾燥させることによって付着または含有させることができる。このような人工骨は骨欠損部に移植され、欠損部に強固に固定される。人工骨の固定化剤は、有効成分であるヘリオキサンチンを、医薬として使用する際生理的に許容される分散媒、結合剤、希釈剤、骨再生に有効な他の成分（例えばカルシウム）などと混合して調製することができる。人工骨固定剤は、これを人工骨に付着または含有させることなく、宿主の骨欠損部に移植される人工骨とその骨欠損部との隙間に充填するように用いることもできる。なお、ここで述べた非経口の組成物は、BMPファミリーなど骨形成を促進させる蛋白質を付着または含有させて用いることもできる。

【0025】

【実施例】以下に実験例および実施例を示し、本発明の

細胞分化誘導因子作用増強剤の作用効果および実施態様を具体的に説明するが、これらは単なる例であって、本発明をなんら限定するものではない。

【0026】実験例1

マウス骨芽細胞株におけるアルカリ性ホスファターゼ(ALP)産生誘導
マウス由来骨芽細胞株MC3T3-E1を10%ウシ胎仔血清(FCS: fetal calf serum)含有 α -最小必須培地(MEM: minimum essential medium)中で96穴プレートに播種し(8000/well)、2日後BMP-4/7ヘテロ二量体(特願平6-111255号に記載)を3ng/ml含むまたは含まない培地で表1に示す濃度に希釈した検体を一面に生育(コンフルエント)した細胞に加えて72時間培養を続けた。プレートを生理食塩水で一回洗浄した後、基質溶液を加えて室温で15分間インキュベートした。0.05Nの水酸化ナトリウムを加えて反応を停止させ、405nmの吸光度を測定した。その結果、表1に示すとおり、ヘリオキサンチンはBMP活性即ちBMPによるALPの産生誘導を増強することが、またBMPの有無にかかわらず単独でも優れたALP産生誘導活性を有していることが証明された。

【0027】

【表1】

マウス骨芽細胞株(MC3T3-E1)における
アルカリ性ホスファターゼ(ALP)産生誘導

ヘリオキサンチン最終濃度 (M)	ALP活性 (1000 \times A ₄₀₅ \pm SD)	
	BMP添加(3ng/ml)	BMP無添加
0 (無添加対照)	94 \pm 7	35 \pm 3
1.6 \times 10 ⁻⁸	162 \pm 12 *	59 \pm 4 *
1.3 \times 10 ⁻⁷	336 \pm 39 *	106 \pm 11 *
1.0 \times 10 ⁻⁶	574 \pm 55 *	239 \pm 11 *

*: 統計学的に有意な効果が認められたもの (p<0.001 vs 対照; t-検定)

【0028】実験例2

ラット副腎髄質由来細胞株における神経突起の伸長能
10%FCSを添加したダルベッコ(Dulbecco) MEM中に懸濁したPC12細胞(ラット副腎髄質褐色細胞種; 2000/well)を図1に示す各種濃度のNGFおよびヘリオキサンチンを含む検体と混合し、96穴プレートに播種した後、3日間培養した。培養液を除き、市販キット[ディフクイックR、国際試薬(株)、神戸市]を用いてヘマトキシリン/エオシン染色を行った。顕微鏡観察によって神経突起の伸長を評価した結果を図1に示す。NGF 10ng/ml存在下にヘリオキサンチン1 μ Mまたは10 μ Mを添加することにより、試料細胞の神経突起の著しい伸長が観察された。即ち、NGF 10ng/ml存在下での1 μ Mまたは10 μ Mのヘリオキサンチン添加は、NGF単独での100ng/ml処理による効果と同等以上の効果を示し、ヘリオキサンチンの神経成長因子作用増強活性が認められた。

【0029】実験例3

ヘリオキサンチンによるマウス骨芽細胞株の石灰化促進作用

マウス骨芽細胞株MC3T3-E1を24穴プレートに10⁴/wellで播種し、翌日から3ng/mlのBMP存在下あるいは非存在下で各種濃度のヘリオキサンチンを含む10%FCS, 10mM β -glycerophosphate, 50 μ g/mlアスコルビン酸含有 α -MEM培地中で10日間培養した。細胞をPBSで1回洗浄した後、6N塩酸を0.2ml加えた。5分後、この溶液を回収して比色定量キット(カルシウムE-テストワコー、和光純薬)を用いてカルシウム含量を測定した(n=3)。その結果、図2に示すように、BMP単独処理では明らかな石灰化が認められなかったのに対し、10あるいは1 μ Mのヘリオキサンチンを同時処理すると石灰化が顕著に促進され、ヘリオキサンチンはBMPによる分化誘導作用を明らかに増強する事が判明した。また、10 μ Mのヘリオキサンチン単独処理では無処理群に比べて石灰化が有意に促進されたが、これは内在性のBMPの作用を増強したためと考えら

れる。

【0030】実験例4

ヘリオキサンチンによるラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化促進作用

5週令の雄SDラットの大腿骨から得た間質細胞を24穴プレートに 10^4 /wellで播種し、翌日から各種濃度のヘリオキサンチンを含む15%CS、10mM β -glycerophosphate、50 μ g/mlアスコルビン酸、 10^{-7} Mデキサメタゾン含有 α -MEM培地で13日間培養した。培養47113日目に細胞をPBSで1回洗浄した後、細胞に基質液(実験例1を参照)を直接加えることによってアルカリ性ホスファターゼ活性を測定した(n=3)。また、6N塩酸を0.2ml加え、溶液を回収してカルシウム含量を比色定量キット(カルシウムE-テストワコー、和光純薬)を用いて測定した(n=3)。その結果、図3に示すように、ヘリオキサンチンは用量依

存的にアルカリ性ホスファターゼ活性を増大させ、それらは培養期間が長くなるにしたがって顕著になった。また、図4に示すように、ヘリオキサンチン処理群では培養11日目から急速に石灰化が促進されることが判明した。以上の結果から、ヘリオキサンチンは生体内における骨芽細胞の前駆細胞に作用してその成熟分化を促進する作用を有することが示される。このヘリオキサンチンの作用は、低濃度の内在性BMPによる刺激を増強した結果であると考えられる。

【0031】実施例1

下記に示す(1)~(6)の成分を混合して剤型形成機で1錠当たりヘリオキサンチン5mgを含有する直径6.5mmの素剤を約1,000錠作製できる。これを下記に示す(7)~(9)の成分で被覆し、直径6.6mmフィルムコーティング錠が得られる。

(1)ヘリオキサンチン	5g
(2)乳糖	82.5g
(3)ヒドロキシプロピルセルロース	2.8g
(4)ステアリン酸マグネシウム	0.4g
(5)ヒドロキシプロピルメチルセルロース2910	2.994g
(6)トウモロコシデンプン	19.3g
(7)マクロゴール6000	0.6g
(8)酸化チタン	0.4g
(9)二三酸化鉄	0.006g

【0032】実施例2

下記に示す(1)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)および(8)の成分を精製水に懸濁あるいは溶解し、下記の(2)の核粒にコーティングし素細粒を作製できる。この素細粒上に

下記に示す(9)~(11)の成分をコーティングしコーティング細粒を作り、下記の(12)の成分と混合してヘリオキサンチン細粒1%、約500gを作製し得る。これを500mgずつ分包する。

(1)ヘリオキサンチン	5g
(2)乳糖・結晶セルロース(粒)	330g
(3)D-マンニトール	29g
(4)低置換度ヒドロキシプロピルセルロース	20g
(5)タルク	25g
(6)ヒドロキシプロピルセルロース	50g
(7)アスバルテム	3g
(8)グリチルリチン酸二カリウム	3g
(9)ヒドロキシプロピルメチルセルロース2910	30g
(10)酸化チタン	3.5g
(11)黄色三二酸化鉄	0.5g
(12)軽質無水ケイ酸	1g

【0033】

【発明の効果】本発明の細胞分化誘導因子作用増強剤は、例えば、強いBMP作用増強活性および骨形成促進活性を有し、骨組織に作用して骨量と骨強度を増加させる。従って、本剤は骨粗鬆症、骨折治癒促進または骨再建促進など種々の骨疾患の治療および予防に有用である。また、本剤は神経栄養因子の作用増強活性を有し、アルツハイマー型痴呆症および一般の老人性痴呆症、運動ニューロン障害(筋萎縮性側索硬化症など)、糖尿病性の末梢神経障害など種々の神経性疾患の治療および予

防に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヘリオキサンチンによるラット副腎髄質由来細胞株における神経突起の伸長能を示す。

【図2】ヘリオキサンチンによるマウス骨芽細胞株の石灰化促進作用を示す。一群3穴の平均値と標準偏差値を示す。

*BMP単独処理群と統計学的有意差が認められたことを示す($p < 0.05$, t-検定)。

#無処理対照群と統計学的有意差が認められたことを示

す($p<0.05$, t-検定)。

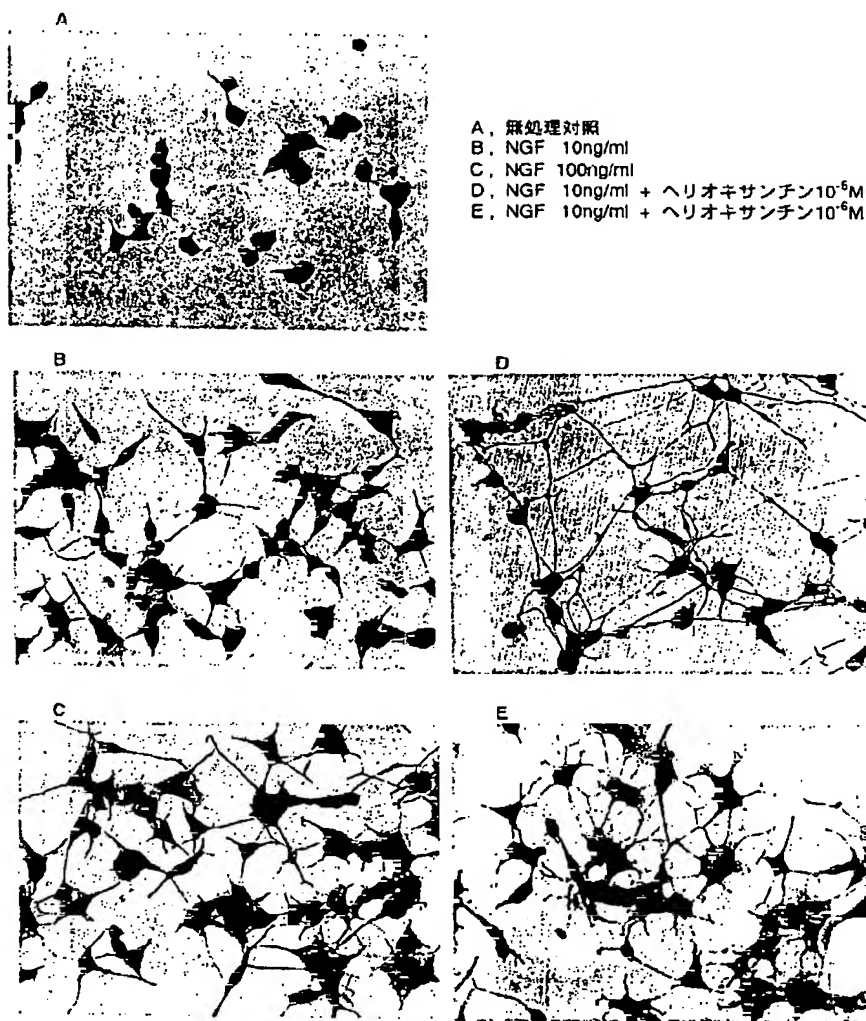
【図3】 ヘリオキサンチンによるラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化促進作用を示す。一群3穴の平均値と標準偏差値を示す。

, * 無処理対照群と統計学的な有意差が認められたことを示す(; $p<0.01$, *; $p<0.05$, t-検定)。

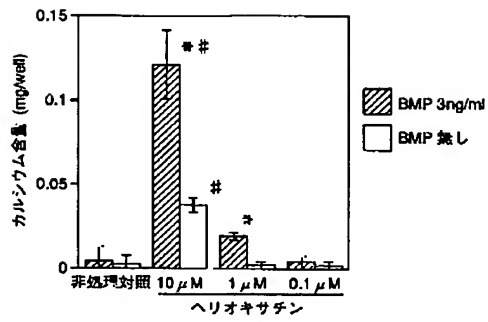
【図4】 ヘリオキサンチンによるラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化促進作用を示す。一群3穴の平均値と標準偏差値を示す。

, * 無処理対照群と統計学的な有意差が認められたことを示す(; $p<0.01$, *; $p<0.05$, t-検定)。

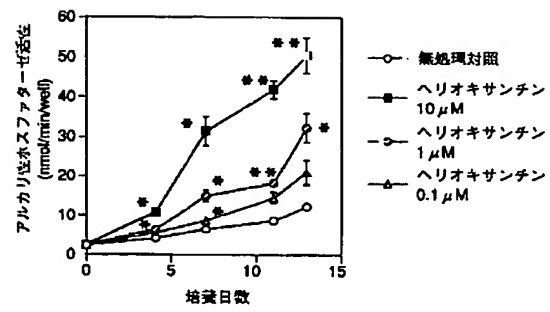
【図1】



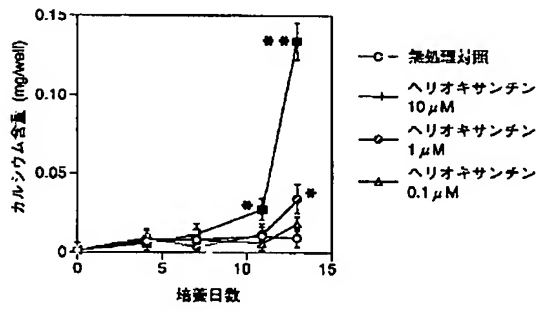
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
C 07 D 493/04
// A 61 L 27/00

識別記号
1 0 1

庁内整理番号

F I
C 07 D 493/04
A 61 L 27/00

技術表示箇所
1 0 1 A
F